

Trabalho de Conclusão de Curso

PAPEL DAS CÉLULAS-TRONCO NA REGENERAÇÃO ÓSSEA

Priscila Martins



**Universidade Federal de Santa Catarina
Curso de Graduação em Odontologia**

Priscila Martins

PAPEL DAS CÉLULAS-TRONCO NA REGENERAÇÃO ÓSSEA

Trabalho apresentado à Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para conclusão do Curso de Graduação em Odontologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro

Florianópolis
2014

Priscila Martins

PAPEL DAS CÉLULAS-TRONCO NA REGENERAÇÃO ÓSSEA

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de cirurgião-dentista e aprovado em sua forma final pelo Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 24 de julho de 2014.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Ariadne Cristiane Cabral da Cruz
Membro
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a MSc Isis Carvalho Encarnação
Membro
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho à minha família,
meu namorado e amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre proporcionar bênçãos em minha vida, uma das mais importantes foi o ingresso na odontologia da UFSC.

Aos meus pais, pela minha educação, por todo esforço que fizeram por mim e pelo amor incondicional.

À minha irmã, pelo exemplo de esforço e dedicação.

Ao meu namorado, pela paciência, carinho e companheirismo.

Aos meus familiares e amigos, que sempre deram força para as conquistas em minha vida.

À minha dupla, Bárbara Clementina Brandt, por esses anos de amizade, troca de aprendizado e parceria no cursinho, faculdade, hotel, festas, estudos, como dupla, enfim pela disposição quando eu precisava.

Às amigas que a faculdade me proporcionou, Fabiula Máisa Paludo, Marcela Souza Lima, Michelli Cássia dos Santos e Vanessa Lima Lodetti, vocês me ensinaram muito durante esses anos de faculdade, vou levá-las sempre no coração.

À minha turma 9.2, por sempre lutar pelos nossos objetivos, com certeza despertaram, em mim, um instinto de luta pelo melhor.

Aos meus mestres, pelos ótimos ensinamentos.

À minha orientadora, Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro, por fazer desta temerosa etapa de TCC um pouco mais tranquila em vida, por estar sempre disposta a me ajudar e ensinar.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

Resumo

A perda dos elementos dentais leva à reabsorção do rebordo alveolar, com posterior alteração do terço inferior da face e do padrão estético do paciente. As técnicas de reconstrução com enxerto de osso autógeno apresentam resultados positivos, com ganho adequado de osso, mas têm como grande desvantagem a necessidade de um segundo sítio cirúrgico para a doação do tecido ósseo. Algumas opções para substituir ou repor o tecido ósseo perdido vêm sendo estudadas. Neste contexto aparecem as células-tronco (CT), que apresentam a capacidade de autorrenovação e de gerar células diferenciadas de diferentes tipos de tecidos, e, por isso, demonstram potencial para reparar tecidos lesados ou perdidos. A Engenharia de Tecidos é uma nova disciplina que abrange os princípios e métodos da biologia e da engenharia, para desenvolver substitutos para o reparo e a regeneração de tecidos lesados ou perdidos, e envolve a tríade células, arcabouço (*scaffold*) e indutores biológicos. No campo da Odontologia, essa nova abordagem traz a esperança de regeneração de tecido ósseo e dentário, ligamento periodontal, polpa e esmalte e, quem sabe, até o desenvolvimento de novos dentes. O rápido avanço que vem acontecendo na área de engenharia tecidual, a partir do descobrimento e estudo das células-tronco de origem dental, dos fatores indutores de diferenciação e dos diversos materiais disponíveis para uso como arcabouços, justifica a realização deste estudo cujo objetivo foi realizar uma revisão de literatura para verificar o estado da arte quanto ao uso de células-tronco na regeneração e engenharia de tecido ósseo. Para isso foi realizado um levantamento bibliográfico de artigos atuais e livros e artigos clássicos relacionados aos temas células-tronco e regeneração óssea, entre o ano de 1994 até 2014. A literatura mostra que as CT apresentam capacidade de autorrenovação e, quando se multiplicam, podem permanecer com as características de indiferenciação ou se diferenciar em outros tipos celulares. Dentre Os tipos de CT estão as embrionárias (CTE) e as adultas (CTA), dependendo da fonte tecidual de onde as mesmas são obtidas. Para vencer as barreiras éticas e legais do uso de CTE, os pesquisadores têm se voltado cada vez mais para os estudos utilizando CT de tecidos adultos, tanto no que diz respeito às análises do perfil gênico/molecular dessas células, quanto à diferenciação celular e perspectivas de aplicação clínica. Existem diversas fontes de CTA, tais como cordão umbilical, medula óssea, tecido adiposo, tecidos dentários, entre outras. Mas as fontes

teciduais ideais para a obtenção das CTA são aquelas em que a coleta causa a menor morbidade possível, porém garantindo quantidade suficiente de células para isolamento e expansão. Para a aplicação terapêutica das CT, principalmente na área odontológica, os arcabouços são necessários para, além de fornecer o suporte mecânico, garantir a interação com as substâncias da matriz extracelular. Para chegar ao arcabouço ideal muitas propriedades estão sendo estudadas como a composição química, a carga eletrostática, a textura superficial/rugosidade, a configuração geométrica, e a modificação biomimética, pois dentro dessas propriedades existem muitas opções de materiais. Para fechar a tríade da regeneração óssea, as moléculas indutoras do crescimento e diferenciação celular, como as BMPs, TGF- β , FGF, IGF, VEGF, PDGF, EGF, PTH / PTHrP e interleucinas, atuam na cascata de formação do osso estimulando a migração, mitose, angiogênese e, proliferação e a diferenciação celular. Através desses mecanismos elas ativam outras moléculas e preparam o meio para a regeneração óssea, podendo ser adicionadas no momento do implante ou previamente incorporadas ao arcabouço. O uso do PRP é um protocolo já consolidado há alguns anos na área da medicina e da odontologia, e utilizado com sucesso em diversas pesquisas, onde o PRP atua como arcabouço e fornece fatores de crescimento que aceleram o processo de regeneração óssea. Entretanto, embora diversos materiais venham sendo estudados ao longo dos anos, ainda não há consenso de qual arcabouço é o ideal ou o mais indicado, bem como ainda não há definição dos fatores indutores de diferenciação mais adequados, e a sua concentração e disponibilização espacial e temporal, para aplicação clínica em casos de reconstrução e regeneração óssea. Após esta revisão pode-se concluir que a regeneração óssea com CT é algo possível de acontecer. Alguns estudos nessa área já obtiveram sucesso, porém mais pesquisas devem ser realizadas, principalmente na área da odontologia, para o desenvolvimento de protocolos terapêuticos clínicos seguros e de eficácia previsível.

Palavras-chave: Células-tronco. Regeneração Óssea. *Stem Cells*. *Bone Regeneration*.

ABSTRACT

Tooth loss leads to alveolar bone resorption, followed by modification of the inferior third of the face and esthetic pattern of the patient. Techniques for reconstruction using autogenous bone graft have presented positive outcomes, showing adequate bone tissue gain, but they have as disadvantage the need of a secondary surgical site for donation of bone tissue. Therefore, some options have been proposed to substitute or replace the lost bone. In this context studies have looked for stem cells, which are cells that show the ability of self-renewing and differentiation into cell types from different tissues and, therefore, hold potential to repair damaged or lost tissues. Tissue Engineering is a new discipline that covers the principles and methods from Biology and Engineering in order to develop substitutes to repair or regenerate tissues, and involves the triad of cells, scaffolds and morphogens. In Dentistry, this new approach brings hope to bone and dental tissue regeneration, as periodontal ligament, dental pulp and enamel, as well as the possibility of developing new teeth. The rapid progress in this field, from the discovery and study of stem cells of dental origin, the factors that induce cell differentiation and the materials available for scaffolding, justifies this study which aim was to carry out a literature review to verify the state of the art regarding the use of stem cells in bone regeneration and tissue engineering. For that, it was performed a literature survey for up-to-date manuscripts as well as books and classical papers related to stem cells (SCs) and bone regeneration, published from 1994 to 2014. Literature shows that SCs present the capacity for self-renewal and, when multiplying, can stay as undifferentiated cells or begin a differentiation process. The types of SCs are embryonic (ESCs) and adult (ASCs) depending on the tissue source from where they are obtained. To overcome the ethical and legal barriers for the use of ESCs, researches have been increasingly turned to study ASCs, regarding both the genic/molecular profile of these cells and the cell differentiation for clinical application. There are several tissue sources of SC, as umbilical cord, bone marrow, adipose tissue, dental tissues, among others, but the ideal sources are those that cause less morbidity to the patient for their collection, but guarantying enough cell counts for isolation and expansion. For clinical SC applications, mainly in Dentistry, scaffolds are necessary in order to, besides serving as mechanical support for the cells, guarantee their interaction with the extracellular matrix. Several materials have

been studied regarding chemical composition, electrostatic load, texture/roughness surface, and geometrical configuration, in order to find the ideal scaffold. To complete the triad of bone regeneration, inductive molecules related to cell growing and differentiation, such as BMPs, TGF- β , FGF, IGF, VEGF, PDGF, EGF, PTH / PTHrP and interleukins, act in the cascade of bone forming stimulating cell migration, proliferation and differentiation, and are involved in angiogenesis and mitosis processes. Through these mechanisms those growth factors activate other molecules and prepare the environment to bone regeneration and, therefore, they may be added at the moment of scaffold implantation or previously incorporated to the scaffold. The use of platelet-rich plasma (PRP) is a consolidated protocol in the fields of Medicine and Dentistry, and has been successfully applied in several studies where the PRP acts as scaffold and provides growth factors that accelerate the bone regeneration process. However, though several materials have been studied in the last years, there is yet no consensus regarding the ideal scaffold, or at least the most indicated, as well as there is no definition about the appropriated inductors, their concentration, and spatial and temporal delivery and action for clinical application in cases of reconstruction and regeneration of bone tissue. After this literature review, it can be concluded that the bone regeneration using SCs is something possible for future clinical use. Some studies have already showed success; however, more research is necessary in order to develop safe and predictably effective therapeutic protocols.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP - Fosfatase alcalina

ASC - Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo

BMP - Proteínas ósseas morfogenéticas

BMSC - Células-tronco mesenquimais da medula óssea

CLP - Pacientes com fissura labiopalatina

CLPMDSC - Células-tronco derivadas do músculo orbicular da boca de pacientes com fissura labiopalatina

CT - Células-tronco

CTA- Células-tronco adultas

CTE - Células-tronco embrionárias

CTM - Células- tronco mesenquimais

DPSC - Células-tronco de polpa de dentes permanentes

EGF - Fator de crescimento epidérmico

FGF - Fator de crescimento de fibroblastos

HA - Hidroxiapatita

HLA - Antígeno Leucocitário Humano

IGF - Fator de crescimento tipo insulina

iPSCs - Células-tronco pluripotentes induzidas

ISCT - *International Society for Cellular Therapy* (Sociedade Internacional para Terapia Celular)

MC - Membrana de colágeno

MEC - Matriz extracelular

OOM - Fragmento do músculo orbicular da boca

PAI-1- Inibidor do ativador do plasminogênio

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas

PDLSC - Células-tronco do ligamento periodontal

PF-4 - Fator plaquetário 4

PRP - Plasma rico em plaquetas

PTH / PTHrP - Hormônio paratireoidiano

qRT-PCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real após conversão pela transcriptase reversa.

SBP- DPSC – Derivados osteoblásticos de células-tronco da polpa dentária

SHED - Células-tronco da polpa de dentes decíduos esfoliados

TGF- β - Fator de crescimento de transformação beta

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

β -TG - Tromboglobulina beta

Sumário

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3 METODOLOGIA.....	21
4 REVISÃO DE LITERATURA	22
4.1 Células-tronco	22
4.2 Arcabouços	28
4.3 Moléculas indutoras do crescimento e diferenciação celular	30
5 DISCUSSÃO	35
6 CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS.....	39

1 INTRODUÇÃO

A ideologia de sorriso perfeito faz com que as pessoas se preocupem e busquem, além dos dentes, os tecidos de suporte, osso e gengiva, que também foram perdidos (BUSENLECHNER et al., 2005). Com a perda dos elementos dentais vai ocorrendo reabsorção do rebordo alveolar, que altera o terço inferior da face e modifica a estética do paciente (SCHMIDLIN; JUNG; SCHUG, 2004).

Outros casos que necessitam de regeneração tecidual são os tratamentos de defeitos ósseos extensos devido a traumas ou patologias, em especial em cirurgia crânio-maxilo-facial e ortopédica (CASTRO-SILVA; ZAMBUZZI; GRANJEIRO, 2009), ou as malformações congênitas, como as fissuras labiais e palatinas (BUENO et al., 2009).

Segundo Kempen et al. (2010) “o osso é o segundo tecido mais transplantado, depois do sangue”. As técnicas de reconstrução com enxerto de osso autógeno, de acordo com a literatura, apresentaram resultados positivos, com ganho ósseo adequado (MARX, 1994; MISCH et al., 1992). Porém, uma das desvantagens é a necessidade de uma segunda cirurgia para a doação de osso (MACEDO et al., 2007).

Conforme Macedo, Macedo, Monteiro (2009) podem-se usar também enxertos homólogos, osso humano fresco congelado que, na Odontologia, provém de bancos de tecidos musculoesqueléticos, e é utilizado, com excelentes resultados, em regenerações ósseas guiadas para tratamento de tumores odontogênicos.

Por causa do crescente número de transplantes ósseos e pelas desvantagens dos enxertos autógenos nas complicações trans e pós-operatórias como parestesias temporárias, disestesias, infecções, fratura de crista ilíaca, hemorragias, dores e desconforto na locomoção (NEO; MATSUHITA; MORITA, 2000), opções para substituir ou repor o tecido ósseo perdido vêm sendo estudadas.

A esperança de se replicar tecidos adultos, por métodos biológicos, e utilizá-los na substituição de tecidos lesados está ficando cada vez maior. No campo da Odontologia, essa esperança recai na regeneração de tecido ósseo e dentário, como ligamento periodontal, polpa e esmalte e, quem sabe, até desenvolver novos dentes (THESLEFF; TUMMERS, 2003). Segundo Pignone (2011), estudos com células-tronco da polpa dentária têm mostrado capacidade de diferenciação em

odontoblastos, osteoblastos e regeneração do complexo dentino-pulpar e de tecido ósseo.

As células-tronco (CT) apresentam a capacidade de auto-renovação e de gerar células diferenciadas de tipos especializados de tecidos (MORRISON; SHAH; ANDERSON, 1997) e, por isso, apresentam potencial para reparar tecidos lesados ou perdidos. Podem-se encontrar células-tronco adultas (CTA) em vários tecidos, como o hematopoiético, a pele, o osso, o epitélio intestinal (FUCHS; SEGRE, 2000; WATT; HOGAN, 2000) e, também, na polpa dental (GRONTHOS et al., 2000). Evidências comprovam que CT de tecidos adultos têm o potencial de produzir uma variedade de tipos celulares (BJORNSON et al, 1999). Segundo Bydlowski et al. (2009) as células-tronco mesenquimais (CTM) possuem menor capacidade de diferenciação que as células-tronco embrionárias (CTE), porém elas apresentam uma maior facilidade de isolamento, capacidade de expansão em cultura e não são imunogênicas.

Conforme Langer e Vacanti (1993); Persidis (1999) e Chapekar (2000), a engenharia de tecidos abrange os princípios e métodos da biologia e da engenharia para desenvolver substitutos para o reparo e a regeneração de tecidos. A engenharia tecidual envolve a tríade células-tronco, arcabouço (*scaffold*) e osteoindutores (RAUH, et al., 2011). Para a engenharia de tecido ósseo, os materiais osteoindutores estimulam as células indiferenciadas a se diferenciarem em osteoblastos, que são responsáveis pela formação óssea. São usados como biomateriais osteoindutores o osso autógeno, fatores de crescimento ósseo e as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) (JACQUES et al., 2004; VITAL et al., 2006).

O rápido avanço que vem acontecendo na área de engenharia tecidual, a partir do descobrimento e estudo das células-tronco de origem dental, dos fatores indutores de diferenciação e dos diversos materiais disponíveis para uso como arcabouços, justifica o objetivo deste estudo que foi realizar uma revisão de literatura para verificar o estado da arte quanto ao uso de CT na regeneração e engenharia de tecido ósseo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar uma revisão da literatura sobre regeneração óssea.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Apresentar o estado da arte sobre o uso de células-tronco pós-natais para regeneração de tecido ósseo;
- b) Identificar os principais tipos de células-tronco utilizados para a regeneração óssea;
- c) Identificar os principais tipos de arcabouços empregados na regeneração tecidual óssea;
- d) Apresentar os fatores de crescimento envolvidos na regeneração e engenharia de tecido ósseo.

3 METODOLOGIA

Este estudo foi realizado por meio de um levantamento bibliográfico de artigos atuais e livros e artigos clássicos relacionados aos temas células-tronco e regeneração óssea.

Os artigos lidos para esta revisão foram pesquisados nas bases de dados PubMed, LILACS e SciELO, e também em ferramentas de busca como o Google Acadêmico.

Os termos pesquisados foram: células-tronco e regeneração óssea e *stem cells and bone regeneration*. Foram analisados os artigos que abordavam o tema células-tronco pós-natais relacionadas à regeneração óssea.

Um levantamento inicial, feito nessas bases de dados e na ferramenta de busca, resultou em 5.727 artigos. Destes, foram selecionados os artigos mais recentes, a partir do ano de 1994 até 2014, totalizando 131, incluindo pesquisas, revisão de literatura, revisão sistemática e casos clínicos nas línguas portuguesa, inglesa e espanhola.

Os dados necessários para a realização da revisão da literatura foram obtidos através da leitura dos artigos na íntegra e os dados levantados foram agrupados em subitens com o objetivo de sistematizar os achados.

4 REVISÃO DE LITERATURA

“Engenharia tecidual é definida como o campo da ciência que estuda a restauração funcional e fisiológica de estruturas teciduais deterioradas ou perdas teciduais decorrentes de doenças como o câncer ou trauma”. (NAKASHIMA; REDDI, 2003). A engenharia tecidual se baseia em três componentes: as células-tronco, o arcabouço (*scaffold*), que representa uma matriz extracelular (MEC) e mantém o contorno do tecido, e as moléculas indutoras do crescimento e diferenciação celular. (REDDI, 1998).

4.1 Células-tronco

Segundo Morrison, Shah e Anderson (1997) as CT, células fonte ou *stem cells*, são células com baixo grau de diferenciação, que têm a capacidade de se auto-reproduzirem e de gerarem células diferenciadas de tipos especializados de tecidos. Elas mantêm-se indiferenciadas por longos períodos, tanto *in vivo* como *in vitro*, mas com estímulos específicos podem diferenciar-se em células maduras e funcionais (ZAGO; COVAS, 2006).

As CT são classificadas segundo sua potencialidade em toti, pluri ou multipotentes. Totipotentes são as células que podem gerar todos os tipos celulares embrionários e extra-embrionários, como o zigoto; as pluripotentes têm a capacidade de gerar todas as células que formam o embrião e são provenientes da massa interna do blastocisto (CTE); as multipotentes são as células que originam apenas um subgrupo de linhagens celulares, por exemplo, as CTM e neurais (SCHWINDT; BARNABÉ; MELLO, 2005).

Segundo Alwattar, Schwarzkopf e Kirsch (2011) de acordo com a fonte, as CT são classificadas em células-tronco embrionárias (CTE), células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) e células-tronco adultas (CTA), frequentemente isso se correlaciona com sua plasticidade. As CTE são retiradas da massa interna do blastocisto, cinco dias após fertilização, e podem ser expandidas em cultura junto com fatores que inibem sua diferenciação. As CTA são estimuladas à diferenciação na presença de fatores de crescimento ou outros estímulos externos; as CT hematopoiéticas e mesenquimais são exemplos de CTA (SCHWINDT; BARNABÉ; MELLO, 2005). Já as iPSCs são células diferenciadas que podem ser

reprogramadas geneticamente para um estado semelhante ao embrionário (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). Embora as CTE apresentem as melhores perspectivas de diferenciação, questões éticas e legais estão envolvidas, já que um embrião é destruído para o isolamento dessas células, além de apresentarem uma maior dificuldade de controlar o seu crescimento, diferenciação e potencial de malignidade, o que tem comprometido o seu emprego com vistas à medicina regenerativa (IVANOVSKI et al., 2006).

Devido às questões éticas e legais relacionadas à obtenção de CTE, os pesquisadores têm se voltado para a busca de novas fontes de células indiferenciadas com potencial múltiplo de diferenciação. Deste modo, descobriu-se que tecidos e órgãos adultos contêm células indiferenciadas que se mantêm em um estado não-proliferativo, quiescente, durante a maior parte da sua vida, mas que, quando estimuladas por dano ou remodelação tecidual, entram novamente no ciclo celular para manter a reserva de células indiferenciadas (capacidade de auto-renovação), enquanto geram células progenitoras que derivarão uma variedade de tipos celulares diferentes capazes de renovação, regeneração tecidual e manutenção da homeostase (multipotencial de diferenciação) (SONG et al., 2006).

As CTA são o foco da maioria das pesquisas com regeneração óssea, pois representam um “transplante” de células autólogas ou alogênicas, com prévia manipulação laboratorial (isolamento, purificação e expansão em cultura) (ZAGO; COVAS, 2004). As CTA têm se mostrado como uma grande promessa para o uso na região maxilofacial (ZHANG, 2011).

As CTM podem ser obtidas de várias fontes, como medula óssea (PITTENGER et al., 1999), tecido adiposo (JEON, 2008), membrana sinovial (WICKHAM et al., 2003), músculo esquelético (JANKOWSKI; DEASY; HUARD, 2002) e dentes (MIURA et al., 2003). Elas podem se diferenciar em osteoblastos, condrócitos, adipócitos e miócitos (PITTENGER et al., 1999). De acordo com vários autores, as CTM podem ser uma boa alternativa a outros tipos de células para reparo e regeneração de osso (NAKAJIMA et al., 2007; MORISHITA et al., 2006; MINAMIDE et al., 2007; KHOJASTEH; ESLAMINEJAD; NAZARIAN, 2008; JAFARIAN et al., 2008).

Além da sua boa capacidade de diferenciação osteogênica e da fácil obtenção a partir de tecidos diferentes, as CTM apresentam propriedade imunomoduladora, o que é fundamental para a medicina regenerativa. Essa

capacidade de modular as respostas imunes torna-as viáveis para serem utilizadas em transplantes alogênicos, sem qualquer risco de rejeição imune (UNDALE et al., 2009).

Para a caracterização das CTM, existe um protocolo mínimo que garante a indiferenciação e o potencial dessas células. *The Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy (ISCT)* propõe critérios para definir as células como sendo CTM humanas, tanto para uso laboratorial em investigação científica quanto para estudos pré-clínicos. Primeiro, as CTM têm que demonstrar capacidade de aderência ao plástico. Segundo, devem expressar determinados antígenos de superfície: $\geq 95\%$ da população de CTM devem expressar CD105, CD73 e CD90 e $\leq 2\%$ devem ser negativas para CD45, CD34, CD14, CD11b ou CD79a ou CD19 e HLA de classe II. Por último, essas células devem ser capazes de se diferenciar em três linhagens mesenquimais: osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro*. A diferenciação em osteoblastos é confirmada pela coloração com vermelho de *Alizarina* ou *von Kossa*, a diferenciação de adipócitos pela coloração com óleo vermelho O, e a diferenciação em condroblastos é verificada pela coloração com azul *Alcian* ou coloração imuno-histoquímica para colágeno tipo II (DOMINICI et al., 2006). Estes critérios são para CTM humanas. Segundo Tropel et al. (2004), a aderência e capacidade de diferenciação em três linhagens podem ser características de células de outras espécies, mas a expressão dos citados antígenos de superfície não é universalmente bem caracterizada e podem não ser detectados em sistemas não-humanos.

Células-tronco mesenquimais da medula óssea (BMSC, da sigla em inglês *bone marrow stem cells*) têm a capacidade de se diferenciarem em diferentes tipos celulares, como osteoblastos e condrócitos. Estudos mostram que tem se alcançado sucesso na reparação de defeitos ósseos com BMSC autólogas em vários modelos animais (JIANG et al., 2009; MANKANI et al., 2006; PETITE et al., 2000; KON et al., 2000) e, também, conseguiu-se o reparo de defeitos ósseos em humanos, particularmente na mandíbula, utilizando BMSC autólogas (QUARTO et al., 2001; WARNKE et al., 2004). Isso mostra que as BMSCs possuem potencial favorável para a regeneração óssea na região maxilofacial.

As células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ASC, do inglês *adipose stem cells*), são outras possíveis células geradoras de osso. Elas são mais

fáceis de obter, têm menor morbidade para o sítio doador e estão disponíveis em maior quantidade quando comparadas às BMSC (KATZ et al., 2005). Alguns estudos relataram que o reparo bem sucedido dos defeitos ósseos, pode ser conseguido através do transplante autólogo de ASC nos locais de defeito ósseo (COWAN et al., 2004; CONEJERO et al., 2006; YOON et al., 2007). Um caso clínico de 2004 relatou que a combinação de ASC autólogas e cola de fibrina repararam, com sucesso, defeitos traumáticos extensos na calota craniana de uma menina de sete anos de idade (LENDECKEL et al., 2004).

A polpa dental, de origem mesenquimal, é formada por células derivadas da crista neural que possuem plasticidade e capacidade multipotencial (KERKIS et al., 2006). A polpa é organizada em quatro camadas sendo, a partir do exterior para o interior: 1) a mais externa, composta por odontoblastos; 2) a camada chamada de "zona livre de células"; 3) a denominada "zona rica em células", que contém células progenitoras que apresentam plasticidade e capacidade pluripotencial; e, 4) a camada mais interna, que compreende a área vascular e o plexo nervoso (SINANAN; HUNT; LEWIS, 2004). As células-tronco da polpa de dentes permanentes (DPSC, do inglês *dental pulp stem cells*) também têm capacidade de se diferenciarem em osteoblastos e formar osso *in vivo*. DPSCs expressam marcadores ósseos tal como fosfatase alcalina (ALP), colágeno do tipo I, e osteocalcina, e apresentam-se como uma nova fonte potencial de células para regeneração óssea em região maxilofacial (GRONTHOS et al., 2000; YAMADA et al., 2010). As células-tronco da polpa de dentes decíduos esfoliados (SHED, do inglês *stem cells from human exfoliated deciduous teeth*) também podem ser uma alternativa para regeneração óssea craniomaxilofacial (MIURA et al., 2003; SEO et al., 2008). As células-tronco do ligamento periodontal (PDLSC, do inglês *periodontal ligament stem cells*) conseguem adotar fenótipos osteogênicos *in vitro*. Várias descobertas sugerem que PDLSC têm muitas propriedades osteoblásticas, como a atividade da ALP, a absorção de cálcio, a expressão de osteocalcina *in vitro* e formação de osso novo *in vivo* (SEO et al., 2004; KATO et al., 2011; HE et al., 2010).

Papaccio et al. (2006) realizaram um estudo no qual analisaram o efeito da criopreservação a longo prazo de células-tronco da polpa dentária e de seus derivados osteoblásticos (SBP-DPSC). Essa informação é importante para averiguar o potencial dessas CT para o armazenamento em longo prazo e para posterior utilização em terapia. A polpa dentária foi extraída de dentes de indivíduos adultos

saudáveis, com idades entre 21 e 45 anos e armazenadas em meio de cultura D-MEM contendo F12 (Invitrogen) com 15% de soro fetal bovino (FBS, Hyclone, Hyclone Laboratories, Logan, UT), 2 mM de L-glutamina, 2 mM de aminoácidos não essenciais (Invitrogen), 100 unidades/mL de penicilina, e 100 mg/mL de estreptomicina (Invitrogen), por dois anos. Elas foram classificadas quanto a critérios morfológicos e antigênicos (primeiro com CD117 e CD34 e, depois, em série para STRO-1 e flk-1 e também CD44, osteocalcina e RUNX-2). Em análise *in vitro*, após dois anos de congelamento, as CT foram recuperadas e foi realizada uma análise por citometria de fluxo para analisar os antígenos que essas expressavam. As análises foram positivas para CD117 (c-kit), CD34, STRO-1 e flk-1, e negativas para CD45. Os resultados da citometria de fluxo mostraram que as intensidades CD117⁺/CD34⁺/STRO-1⁺/FLK-1⁺ foram comparáveis às encontradas nos experimentos prévios utilizando células frescas (LAINO et al., 2005, 2006). A matriz extracelular (MEC) e os fragmentos de tecidos ósseos produzidos pelas células criopreservadas foram analisadas e os autores concluíram que, assim como as amostras de células frescas, as células diferenciadas criopreservadas não foram positivas para marcadores de CT. Na verdade, tornam-se negativas para CD117 e CD34, mas ainda mostraram positividade para STRO-1. Elas também foram negativas para CD14 e CD45, e 100% eram positivas para CD44. Além disso, as células se diferenciaram em dois citotipos: cerca de 30% eram células progenitoras endoteliais e os 70% restantes eram células progenitoras osteogênicas. O ensaio BrDU não revelou diferença significativa na proliferação entre células frescas e criopreservadas. O ensaio TUNEL foi negativo em células criopreservadas indicando que não houve morte celular por apoptose. Histoquimicamente, as células criopreservadas diferenciadas apresentaram positividade importante para ALP e calceína, o que demonstra que estes são os osteoblastos envolvidos no processo de ossificação. As células diferenciadas foram positivas para RUNX-2, para osteocalcina, que é um marcador de osteoblastos de membrana e de tecidos duros, para osteonectina e para ALP óssea, o que confirma que essas células estão envolvidas na produção de proteínas e de matriz para a formação de tecido duro. Adicionalmente, amostras de tecido ósseo obtidas *in vitro* a partir de osteoblastos diferenciados e criopreservados foram recuperadas e transplantadas subcutaneamente no dorso de ratos imunodeprimidos. Quatro semanas após o transplante, as amostras foram coletadas, processadas e analisadas ao microscópio.

Observou-se que o tecido ósseo foi rapidamente remodelado em osso lamelar bem desenvolvido e osteócitos foram encontrados dentro das lamelas, demonstrando assim que as amostras de osso obtidas *in vitro*, a partir de células criopreservadas, podem ser utilizadas para transplantes *in vivo*. Os autores concluíram que as SBP-DPSC podem ser recuperadas com segurança após a criopreservação de longo prazo; essas células rapidamente recomeçam a proliferar, mostrando altas taxas de proliferação, correta expressão dos antígenos de superfície, e produção de tecido ósseo e; essas amostras de osso podem ser facilmente transplantadas *in vivo*, onde elas são remodeladas em osso lamelar.

Um estudo de Bueno et al. (2009), com o objetivo de conseguir uma fonte alternativa de CT com potencial osteogênico e que não gerasse morbidade para o doador, utilizou um fragmento do músculo orbicular da boca (OOM), que é descartado nas queiloplastias de pacientes com fissura labiopalatina (CLP), para o isolamento de CT, denominadas CLPMDSC (Células-tronco derivadas do músculo orbicular da boca de pacientes com fissura labiopalatina do inglês *cleft lip and palate muscle-derived stem cells*). Essas células foram submetidas, *in vitro*, a diferenciação miogênica, condrogênica, adipogênica e osteogênica. Foram criados defeitos cranianos em ratos, o lado direito do defeito continha membrana de colágeno (MC) com CLPMDSC e o lado esquerdo somente MC. A diferenciação osteogênica foi confirmada pela deposição de cálcio através de coloração de von Kossa e por um aumento de c-fos detectada através de qRT-PCR; já as culturas de células não induzidas não apresentaram depósitos de cálcio. Pelo exame histológico do defeito craniano, 20 dias após a cirurgia, observou-se no lado direito, tecido ósseo associado a tecido de granulação. Por outro lado, o sítio esquerdo continha tecido conjuntivo frouxo com infiltrado inflamatório crônico, associado a restos de membrana. Trinta dias após a cirurgia, o lado direito obteve uma redução do tecido de granulação, o osso se encontrava numa fase de maturação avançada, com alguma formação de lamelas nos animais estudados. No lado esquerdo, observou-se neoformação óssea precoce apenas na extremidade do defeito craniano. A amplificação do DNA e a coloração positiva para identificação de núcleos humanos foram obtidas apenas no lado direito, o que confirma que as CT humanas foram responsáveis pela formação do novo osso no defeito craniano crítico. Os autores concluíram que é possível obter CLPMDSC e que estas representam uma fonte não invasiva para reconstrução óssea.

4.2 Arcabouços

Segundo Nakashima e Reddi (2003) arcabouço é uma estrutura que tem a função básica de determinar o contorno do tecido. Eles servem de sustentação para algum material, como por exemplo, as CT (SEONG et al., 2010). A interação entre as substâncias indutoras do crescimento e diferenciação celular com as CT é modulada pela MEC (REDDI, 2001).

Alguns biomateriais estão sendo estudados para serem usados como arcabouços, pois proporcionam o apoio necessário para a proliferação das CT, possuem arquitetura adequada para combinar com a forma final do osso recentemente formado e são adequadamente biodegradáveis, de modo a proporcionar espaço para o tecido recém-formado (HUTMACHER, 2000; SROUJI; KIZHNER; LIVNE, 2006). Para fabricar o biomaterial ideal para a regeneração óssea várias características têm sido investigadas, incluindo (1) composição química, (2) carga eletrostática, (3) textura superficial/rugosidade, (4) configuração geométrica e, (5) modificação biomimética. A composição química é um fator importante para as propriedades osteoindutivas e osteocondutivas. Os arcabouços podem ser fabricados com colágeno, ácido hialurônico, cálcio mineralizado [hidroxiapatita (HA), fosfato tricálcico, cimento de fosfato de cálcio, entre outros], fibrina, ou os seus compostos. Também a matriz dos arcabouços pode ser produzida com polímeros sintéticos, tais como poli-(ácido láctico-co-glicólico), poli-(etileno-glicol), poli-(ϵ -caprolactona), e alumina (HENG et al., 2004). Os íons inorgânicos, que são indispensáveis no processo de formação de osso, podem ser adicionados ao biomaterial para promover a diferenciação osteogênica das CT. Os minerais cálcio, magnésio e silicato contendo cerâmica akermanite têm promovido a diferenciação osteogênica de BMSC, ASC e PDLSC (SUN et al., 2006; LIU et al., 2008; XIA et al., 2011), comparados com cerâmicas de β -tricálcio.

A textura superficial/rugosidade pode ter efeitos moderados sobre a adesão e diferenciação osteogênica das CTM (HENG et al., 2004; BINULAL et al., 2010), enquanto que os seus efeitos de aprimoramento dependem da sensibilidade das CTM à textura da superfície/rugosidade. Mais importante, a configuração geométrica do arcabouço pode ter profundos efeitos sobre a proliferação e a diferenciação osteogênica das CTM. Entre os vários parâmetros geométricos, a forma, a porosidade e o tamanho têm sido amplamente avaliados para diferenciação

osteogênica (FISCHER et al., 2003). Uma menor porosidade estimula a osteogênese por proliferação celular suprimindo e forçando a agregação de células, enquanto que os arcabouços com poros maiores tornam-se rapidamente bem vascularizados favorecendo a osteogênese. Considerando os fatores acima, os arcabouços com tamanhos de poros e interconexões > 300 nm são recomendados para regeneração óssea (HUTMACHER et al., 2007).

Modificações biomiméticas dos biomateriais foram fabricadas para replicar funcionalmente a MEC do tecido ósseo natural. Um arcabouço ideal para regeneração óssea deve ser projetado com base nos constituintes micro e macroestruturais da MEC nativa (STEVENS; GEORGE, 2005). Várias estratégias têm sido investigadas como segue: (1) biomateriais biomiméticos compostos de constituintes inorgânicos ou orgânicos de ossos naturais, tais como nano HA / biomateriais compostos de colágeno (WAHL; CZERNUSKA, 2006; FUKUI et al., 2008), (2) biomateriais carregados com promotores de moléculas de adesão, tais como a sequência Arg-Gli-Asp, laminina, fibronectina e vitronectina (SROUJI; KIZHNER; LIVNE, 2006) e (3) biomateriais carregados com citocinas / fatores de crescimento osteoindutores, incluindo a BMP-2, BMP-7, o IGF-1 e VEGF (SROUJI; KIZHNER; LIVNE, 2006).

De acordo com Hwang e Choi (2010), os fatores para regeneração óssea usando engenharia tecidual incluem CTM indiferenciadas, fatores de crescimento e arcabouço tridimensional (3D). Estudos de engenharia de tecidos ósseos mostraram a possibilidade de utilização das CTM da polpa dental com uma matriz de suporte 3D. Esses arcabouços são mais utilizados para reconstruções ósseas maiores (PIGNONE, 2011).

Os biomateriais, além da biocompatibilidade, devem ter capacidade de ajuste anatômico ao defeito, fornecer suporte mecânico para regenerar e sustentar os tecidos circundantes e disponibilizar fatores bioativos para auxiliar a regeneração do tecido (KRETLOW et al., 2009).

Dusse et al. (2008) relataram que, atualmente, o biomaterial injetável mais usado é o plasma rico em plaquetas (PRP), que acelera o reparo da ferida cirúrgica e a regeneração óssea, pois possui fatores de crescimento derivados das plaquetas que apresentam propriedades anti-inflamatórias e regenerativas.

Outros autores relatam o uso de nano-materiais para a regeneração óssea. Segundo Nuttall e Gimble (2004) existe um aumento no crescimento celular e na

osteodiferenciação em arcabouços nano-estruturados 3D. Para Faghihi e Eslaminejad (2013) o ponto chave na indução de diferenciação por nano-materiais é a descontinuidade na sua superfície, o que leva a mudanças na adsorção de proteínas e à restrição de deposição de MEC pelas células. Isso traz alterações na morfologia celular (ITO, 1999) e na frequência de sítios disponíveis para a adesão celular (MCNAMARA et al., 2010). O substrato nano-estruturado biomimético desempenha um papel importante na diferenciação osteogênica das CTM (FAGHIHI; ESLAMINEJAD, 2013).

Siegel e Fougere (1995) afirmam que nano-material é qualquer tipo de partícula, tubo ou fibra que é feito com metais, cerâmicas, polímeros ou compósitos menores do que 100 nm, em pelo menos uma dimensão. As pesquisas revelam que as propriedades de superfície dos nano-materiais, como as características químicas, rigidez, nano-topografia (SHARMA; SNEDEKER, 2010; PARK et al., 2011; WITKOWSKA-ZIMNY; WROBEL, 2011) e, principalmente, cavidades e ranhuras, têm grande importância sobre a ligação e diferenciação das células (WOOD, 1988).

A fabricação de uma MEC artificial deve ser feita com a máxima semelhança microambiental nativa (FAGHIHI; ESLAMINEJAD, 2013). No osso existem vários tipos de nanofibras de colágeno e HA nanocristalina (PAMULA et al., 2004), onde a MEC nativa tem uma mistura complexa de poros e nervos de diâmetro de escala nanométrica (CURTIS; WILKINSON, 2001; FLEMMING et al., 1999). Dalby et al (2007) mostraram que nanoestruturas circulares aleatórias promovem a diferenciação dos osteoblastos diretamente das CTM, sem qualquer necessidade de promoção osteogênica do meio de cultura das células.

4.3 Moléculas indutoras do crescimento e diferenciação celular

A regeneração óssea é um processo complexo regulado por um grande número de moléculas bioativas, dentre elas (BMPs), fator de crescimento de transformação Beta ($TGF-\beta$), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento tipo insulina (IGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), hormônio paratireoidiano (PTH / PTHrP) e interleucinas (KEMPEN et al., 2010).

No osso, as BMPs são sintetizadas pelas células ósseas e armazenadas na MEC do tecido ósseo (CANALIS; ECONOMIDES; GAZZERRO, 2003). *In vitro*, BMPs podem diferenciar as CTM em osteoblastos (CHENG et al., 2003; LUU et al., 2007). Quando implantadas ectopicamente, as BMPs osteoindutoras podem iniciar a cascata completa de formação do osso, incluindo a migração das CTM e a sua diferenciação em osteoblastos. Esta indução óssea ocorre por ossificação endocondral e intramembranosa, o que resulta na formação de tecido ósseo normal (WOZNEY, 2002).

TGF- β é um fator de crescimento multifuncional, com ampla atividade biológica em vários tipos de células, em diferentes tecidos. Possui três isoformas em seres humanos (TGF- β 1, β 2 e β 3). TGF- β é sintetizado por diferentes tipos de células e é armazenado como um complexo inativo associado a um peptídeo de latência na MEC óssea (LAWRENCE, 2001), mas também pode ser encontrado nas plaquetas. Este fator de crescimento estimula a migração das células osteoprogenitoras e é um regulador potente da proliferação e da diferenciação celular, bem como da síntese de MEC. Essas proteínas possuem efeitos estimulantes e inibitórios sobre a formação óssea, entretanto, em geral, os efeitos estimulantes sobre a cicatrização e a formação óssea predominam (JANSSENS et al., 2005). A relação quanto ao reparo do tecido conjuntivo e à regeneração óssea, deve-se à quimiotaxia e à mitogênese dos osteoblastos, estimulando a deposição de colágeno para a formação óssea e a cicatrização da ferida, além de inibir a formação de osteoclastos e, conseqüentemente, a reabsorção óssea (TÖNZÜM; DEMIRALP, 2003; SYROID et al., 1999).

FGFs são considerados potentes reguladores do crescimento celular e da cicatrização de feridas. No osso, eles são produzidos por diversas células, como os osteoblastos, os macrófagos e as células endoteliais, e são armazenados na sua forma ativa na MEC óssea. FGFs atuam de forma autócrina e parácrina como agente mitogênico em vários tipos celulares. Além disso, estão envolvidos na angiogênese, na cicatrização de feridas e na diferenciação de células (KEMPEN et al., 2010).

IGF-I e IGF-II desempenham um papel importante no metabolismo ósseo e são essenciais para o crescimento do esqueleto e para a manutenção da massa óssea. São sintetizados por vários tecidos e agem de forma endócrina, parácrina e

autócrina. Apesar dos IGFs serem os fatores de crescimento que as células ósseas mais produzem e também os que são armazenados em concentração mais elevada na matriz óssea, ainda não se sabe o seu papel exato na proliferação e na diferenciação das células ósseas, mas apresentam um efeito anti-apoptótico de (pré)-osteoblastos e aumentam a síntese da matriz óssea (NIU; ROSEN, 2005). A administração sistêmica de IGF produz efeitos secundários, tais como hipoglicemia, hipertensão intracraniana, dor de cabeça, fadiga e dispnéia (GEUSENS; BOONEN, 2002). Como consequência disso, provavelmente o IGF nunca será considerado para a regeneração óssea, porém constitui um fator importante para a sobrevivência das células hematopoiéticas, dos fibroblastos e das células do tecido nervoso (SYROID et al., 1999; JOSEPH, et al., 1996).

O VEGF é considerado um dos principais reguladores da angiogênese durante a formação óssea (MEINEL et al., 2003), além de induzir o aumento da permeabilidade capilar. Durante o reparo ósseo, estes novos vasos sanguíneos e alterações vasculares são importantes para o fornecimento de nutrientes e para o transporte de macromoléculas. O VEGF é produzido pela maior parte dos tipos de células e, simultaneamente, a sua expressão pode ser aumentada pela hipóxia ou por outras citocinas (HANSEN-ALGENSTAEDT et al., 2006).

PDGF é considerado um dos principais reguladores da reparação dos tecidos em geral (HOLLINGER et al., 2008). Durante a fase inicial de cicatrização de feridas, as plaquetas são a principal fonte de PDGF. Após injúria e sangramento, as plaquetas se agregam e liberam grânulos carregados de citocinas que contêm várias quantidades de PDGF. Este fator de crescimento regula a migração, a proliferação e a síntese da MEC de uma variedade de células, sendo a primeira proteína presente na ferida e atuando na revascularização, na síntese de colágeno, na regeneração óssea e nos mecanismos de mitose e angiogênese, constituindo-se uma fonte para que outros fatores de crescimento possam atuar (SCHMITZ; HOLLINGER, 2001; SYROID et al., 1999). Uma substância que também contém PDGF é o PRP ou gel de plaquetas.

O EGF estimula a angiogênese, a mitogênese e a permeabilidade vascular, induzindo o crescimento do tecido epitelial, possui também um efeito proliferativo celular nos fibroblastos periosteais e células endoteliais (TÖNZÜM; DEMIRALP, 2003; HUDSON-GOODMAN; GIRARD; JONES, 1990).

As citocinas pertencem a uma família grande e diversa de proteínas que, historicamente, referem-se aos agentes imunomoduladores como interleucinas, interferons, fator de necrose de tumoral, entre outros. Embora os seus mecanismos não sejam bem esclarecidos, tornou-se aparente que várias citocinas estão envolvidas no metabolismo ósseo e que são capazes de estimular ou inibir a formação e função dos osteoclastos, dos osteoblastos, e dos seus precursores celulares (LORENZO; HOROWITZ; CHOI, 2008; NAKASHIMA; TAKAYANAGI, 2008; TAKAYANAGI, 2007; WEITZMANN; PACIFICI, 2005).

Alguns hormônios administrados sistemicamente também aumentam a formação de osso, como o PTH e a vitamina D. Para aumentar a formação óssea, o PTH deve ser administrado de forma intermitente, pois de forma contínua provoca a doença óssea osteíte fibrosa (LOTINUN; SIBONGA; TURNER, 2002; QIN; RAGGATT; PARTRIDGE, 2004). Em seres humanos, o PTH já é usado de forma intermitente para o tratamento de osteoporose, pois aumenta a massa óssea e reduz o índice de fraturas (NEER et al., 2001). Ainda não se sabe exatamente como ocorre esse duplo efeito, mas tem-se sugerido que o estímulo para a formação de osso, induzido por PTH, é devido a um aumento no número de osteoblastos pela ativação das células de revestimento existentes no osso, que sofrem hipertrofia e retomam a síntese da matriz. Outro método proposto para o seu efeito é a inibição da apoptose de osteoblastos (LOTINUN; SIBONGA; TURNER, 2002). Já a vitamina D é um importante regulador da homeostase mineral óssea. Ela tem um papel importante na comunicação osteoblasto/osteoclasto, pois estimula a produção do ligante do receptor ativador do fator nuclear- κ B e inibe a apoptose dos osteoblastos (MONTERO-ODASSO; DUQUE, 2005). Pacientes portadores de osteoporose são tratados com vitamina D para conseguir um aumento da densidade mineral óssea (SHEVDE et al., 2002).

Dusse et al. (2008) realizaram uma revisão da literatura sobre o PRP e a sua aplicação na Odontologia. O gel de plaquetas, constituído essencialmente por PRP, tem sido utilizado para acelerar o reparo de ferida cirúrgica e a regeneração óssea. As plaquetas possuem dois tipos de grânulos, os densos, que secretam adenosina difosfato, adenosina trifosfato, serotonina, cálcio, pirofosfato, P-selectina, fator de transformação do crescimento β , catecolaminas e guanosina di e tri fosfato; e os grânulos α , que secretam proteínas denominadas genericamente como fatores de crescimento derivados das plaquetas, dentre elas os PDGF, TGF- β , IGF, VEGF,

EGF, fibrinogênio, fibronectina, vitronectina, fator V, fator plaquetário 4 (PF-4), β -tromboglobulina (β -TG), inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1), inibidor de plasmina e α_2 -macroglobulina (GERRARD, 1988; KROLL; SCHAFER, 1989). No caso de uma ferida, as plaquetas agregadas liberam o conteúdo dos seus grânulos, quais sejam os fatores de crescimento, que promovem a sinalização para que células mesenquimais e epiteliais cheguem ao local lesado, sofram divisão mitótica, estimulem a síntese de matriz e colágeno e, com isso promovam a cicatrização mais rápida e eficiente; outras proteínas derivadas das plaquetas, como fibrina, fibronectina e vitronectina, também promovem adesão celular e osteocondução (TÖNZÜM; DEMIRALP, 2003; SCHMITZ; HOLLINGER, 2001; HUDSON-GOODMAN; GIRARD; JONES, 1990). O PRP é obtido pela centrifugação do sangue em velocidade baixa, podendo ser utilizado o citrato de sódio como anticoagulante e, assim, sedimentam-se as hemácias e mantêm-se os leucócitos e as plaquetas em suspensão no plasma. A gelificação do PRP é feita através da adição de íons cálcio. É recomendado utilizar sangue autólogo pela possibilidade de transmissão de doenças pelo sangue de outros doadores (DUSSE et al., 2008).

O uso de diferentes protocolos para a obtenção do PRP pode reduzir o número de plaquetas e, com isso, não ser efetivo para a neoformação óssea. Na literatura, vários autores já discursaram sobre a eficiência do PRP (MARX et al., 1998, ANITUA, 1999, CARLSON e ROACH, 2002). Marx et al. (1998) relataram que a eficiência dos fatores de crescimento liberados pelas plaquetas ocorre desde o início da cirurgia, contribuindo para a neoformação óssea desde o primeiro estágio, determinando a aceleração no reparo dos tecidos e produzindo um tecido ósseo de maior densidade. Anitua (1999), em um estudo clínico onde foram avaliados vinte pacientes submetidos à extração dentária prévia à colocação de implantes, verificou que os alvéolos tratados com PRP apresentaram maior espessura óssea no sentido vestibulo-lingual e melhor epiteliação que o grupo que não recebeu PRP (grupo controle). Esse mesmo autor relatou o uso de PRP em outros 250 pacientes com evidências de sucesso clínico. Carlson e Roach (2002), em um estudo retrospectivo das publicações sobre PRP em Odontologia, constataram que o uso do PRP obteve sucesso na maioria dos relatos.

5 DISCUSSÃO

Segundo Rocha (2011), na última década, a pesquisa em Odontologia tem avançado no que diz respeito à engenharia de tecidos, onde tem se buscado novas abordagens para permitir a regeneração tecidual e, até mesmo, para se formar tecidos novos. De acordo com Doan et al. (2010), a engenharia tecidual pode permitir o fornecimento de tecidos para reparos craniofaciais.

Dentro dessa perspectiva, este estudo teve por objetivo realizar uma revisão da literatura sobre o papel das células-tronco na regeneração óssea. Para isto, foi realizada uma busca na literatura científica utilizando as palavras-chave “células-tronco” e “regeneração óssea” e “stem cells” e “bone regeneration”, nas bases de dados PubMed, LILACS e SciELO. Foram analisados os artigos, do ano de 1994 até 2014, que abordavam o tema células-tronco pós-natais relacionadas à regeneração óssea, incluindo pesquisas, revisão de literatura, revisão sistemática e casos clínicos.

A literatura mostra que, em geral, as CT apresentam capacidade de autorrenovação e, quando se multiplicam, podem permanecer com as características de indiferenciação ou se diferenciar em outros tipos celulares (SONG et al., 2006).

O uso de CTE envolvem questões éticas e religiosas, pois embriões são usados para obtenção dessas células, o que levanta o questionamento e as discussões sobre quando começa a vida; para alguns é após a fecundação, enquanto que, para outros, a vida inicia a partir da nidação.

Para vencer as barreiras éticas e legais do uso de CTE, os pesquisadores têm se voltado cada vez mais para os estudos utilizando CT de tecidos adultos, tanto no que diz respeito às análises do perfil gênico/molecular dessas células, quanto à diferenciação celular e perspectivas de aplicação clínica. As CTA são consideradas multipotentes, porém alguns trabalhos indicam que têm a capacidade de originar células de um tipo específico (SCHWINDT; BARNABÉ; MELLO, 2005), apontando para o comprometimento celular com o tecido que lhe deu origem. Segundo Zago e Covas (2004) as CTA são retiradas do próprio paciente e não devem causar rejeição, porém ainda só se conseguiu a diferenciação em um número limitado de tipos celulares adultos. Já as embrionárias, podem diferenciar-se em praticamente todos os tipos de tecidos. Utilizar CTE ou CTA ainda gera dúvidas, pois

cada uma tem as suas vantagens e desvantagens, entretanto, a facilidade de obtenção e “disponibilidade” de CT adultas ao longo da vida dos indivíduos é inegável, embora exista a necessidade de mais estudos com CTA para que se possa entender e controlar o processo de diferenciação celular para fins de aplicação clínica com segurança.

Existem diversas fontes de CTA, tais como cordão umbilical, medula óssea, tecido adiposo, membrana sinovial, músculo esquelético, tecidos dentários, ligamento periodontal, sangue, entre outras. As fontes teciduais ideais para a obtenção das CTA são aquelas que causam a menor morbidade possível ao paciente para a sua coleta, porém garantindo quantidade suficiente de células para isolamento e expansão.

É sabido que a polpa dental, tanto de dentes permanentes como de decíduos, assim como o ligamento periodontal e a papila apical de dentes imaturos, possuem CT, porém essa informação ainda não foi totalmente esclarecida para a população leiga. Esses conhecimentos deveriam ser melhor divulgados, do mesmo modo como acontece com o cordão umbilical, onde a maioria das pessoas sabe que nele há a presença de CT e, por isso, acaba procurando informações para o armazenamento do sangue para uso futuro das CT. Além disso, bancos de CT de dentes esfoliados ou de dentes permanentes sem comprometimento pulpar e que apresentem indicação de extração, poderiam ser criados.

Por outro lado, para a aplicação terapêutica das CT, principalmente na área odontológica, os arcabouços são necessários para, além de fornecer o suporte mecânico e evitar disseminação das células para fora do local de implantação, garantir a interação com as substâncias da MEC. Para chegar ao arcabouço ideal muitas propriedades estão sendo estudadas como a composição química, a carga eletrostática, a textura superficial/rugosidade, a configuração geométrica, e a modificação biomimética, pois apresentando essas propriedades existem muitas opções de materiais. No que diz respeito à regeneração e à engenharia de tecido ósseo, deve-se procurar um arcabouço que seja o mais parecido possível com a estrutura do osso para ajudar no processo da regeneração tecidual. Embora diversos materiais venham sendo estudados ao longo dos anos, ainda não há consenso de qual arcabouço é o ideal ou o mais indicado para aplicação clínica em casos de reconstrução e regeneração óssea.

Para fechar a tríade da regeneração óssea, as moléculas indutoras do crescimento e diferenciação celular, como as BMPs, TGF- β , FGF, IGF, VEGF, PDGF, EGF, PTH / PTHrP e interleucinas, atuam na cascata de formação do osso estimulando a migração, a proliferação, a diferenciação celular e a angiogênese. Através desses mecanismos elas ativam outras moléculas e preparam o meio para a regeneração óssea. Essas moléculas podem ser incorporadas ao arcabouço ou adicionadas ao mesmo no momento do implante, de modo a estimular as células no processo de formação de osso. Diversos grupos de pesquisa vêm estudando as várias opções de uso dessas moléculas, no que diz respeito ao método de biodisponibilização, bem como das concentrações necessárias para estimulação sem efeito tóxico e tempo de exposição.

O uso do PRP já está consolidado há alguns anos na área da medicina e da odontologia, e utilizado com sucesso em diversas pesquisas, onde o PRP fornece fatores de crescimento que aceleram o processo de regeneração óssea. Marx e Garg (1999) utilizaram o PRP nos casos em que as chances de sucesso eram pequenas para os enxertos ósseos convencionais e osseointegração como, por exemplo, em edentulismo total com reabsorção avançada do processo alveolar da maxila, em pacientes com osteoporose e em casos de doença dentária com alteração nos tecidos adjacentes. Carlson (2000) enfatizou as perspectivas da utilização do PRP em enxertos autólogos como um grande avanço do século XXI.

Diante dessa discussão é sabido que, para a obtenção de sucesso na regeneração óssea, deve-se ter o conhecimento sobre as CT, o tipo de arcabouço e as moléculas indutoras do crescimento e da diferenciação celular que poderiam ser empregados para este fim.

6 CONCLUSÃO

Após esta revisão de literatura pode-se concluir que, para se obter a regeneração óssea, precisa-se da tríade células-tronco, arcabouço (*scaffold*) e moléculas indutoras de crescimento e diferenciação celular.

As CTA apresentam a vantagem, em relação às embrionárias, de serem obtidas de tecidos adultos sem inviabilizar um embrião e apresentarem menor possibilidade de malignidade. Inúmeras fontes teciduais estão disponíveis para isolamento das CTA em quantidade suficiente para estudos e/ou aplicações clínicas e com diferentes graus de morbidade para sua obtenção.

Arcabouços fabricados com nano-materiais estão sendo bastante pesquisados, pois, acredita-se que sejam melhores para induzir a regeneração óssea.

As principais moléculas indutoras do crescimento e da diferenciação celular envolvidas na regeneração óssea são: BMPs, TGF- β , FGF, IGF, VEGF, PDGF, EGF, PTH / PTHrP e interleucinas.

Com essa revisão de literatura também se pode concluir que a regeneração óssea com CT é algo possível de acontecer. Alguns estudos nessa área já obtiveram sucesso, porém mais pesquisas devem ser realizadas, principalmente na área da odontologia, para o desenvolvimento de protocolos terapêuticos clínicos seguros e de eficácia previsível.

REFERÊNCIAS

ALWATTAR, B.J.; SCHWARZKOPF, R.; KIRSCH, T. Stem cells in orthopaedics and fracture healing. **Bull NYU Hosp Jt Dis**, v. 69, n. 1, p. 6-10, 2011.

ANITUA, E. Plasma rich in growth factors: a preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. **Int. J. Oral and Maxillofacial Implants**, v. 14, n. 4, p. 529-535, 1999.

BINULAL, N.S. et al. Role of nanofibrous poly (caprolactone) scaffolds in human mesenchymal stem cell attachment and spreading for in vitro bone tissue engineering—response to osteogenic regulators. **Tissue Eng Part A**, v. 16, n. 2, p. 393–404, 2010.

BJORNSEN, C.R. et al. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo*. **Science**, v. 283, n. 5401, p.534-537, 1999.

BUENO D.F. et al. New Source Of Muscle-Derived Stem Cells With Potential For Alveolar Bone Reconstruction In Cleft Lip And / Or Palate Patients. **Tissue Eng Part A**, v. 15, n. 2, p. 427-435, 2009.

BUSENLECHNER D. et al. Alveolar ridge augmentation with a prototype trilayer membrane and various bone grafts: a histomorphometric study in baboons. **Clin Oral Implants Res**, v.16, n. 2, p. 220-227, 2005.

BYDLOWSKI, S.P. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Rev. Bras. Hematol.Hemoter**, v. 31(Supl. 1), p. 25-35, 2009.

CANALIS, E.; ECONOMIDES, A.N.; GAZZERRO, E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. **Endocr Rev** v. 24, n. 2, p. 218-235, 2003.

CARLSON, E.R. Bone grafting the jaws in the 21st century: the use of platelet- rich bone morphogenetic protein. **Alpha Omegan**, v. 93, n. 3, p. 26-30, 2000.

CARLSON, N.E, ROACH Jr., R.B. Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry. **J. Am. Dent. Assoc**, v. 10, n.133, p.1383-1386, 2002.

CASTRO-SILVA, I.I.; ZAMBUZZI, W.F.; GRANJEIRO, J.M. Panorama atual do uso de xenoenxertos na prática odontológica. **InnovImplant J.**, São Paulo, v. 4, n. 3, p.70-75, 2009.

CHAPEKAR, M.S. Tissue engineering: challenges and opportunities. **J Biomed Mater Res**, v. 53, n. 6, p. 617-620, 2000.

CHENG, H. et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). **J Bone Joint Surg Am**, v. 85-A, n. 8, p. 1544-1552, 2003.

CONEJERO, J.A. et al. Repair of palatal bone defects using osteogenically differentiated fat-derived stem cells. **Plast Reconstr Surg**, v. 117, n. 3, p. 857–863, 2006.

COWAN, C.M. et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. **Nat Biotechnol**, v. 22, n. 5, p. 560–567, 2004.

CURTIS, A.; WILKINSON, C. Nanotechniques and approaches in biotechnology. **Trends Biotechnol**, v. 19, n. 3, p. 97-101, 2001.

DALBY, M.J. et al. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. **Nat Mater**, v. 6, n. 12, p. 997-1003, 2007.

DOAN, L. et al. Engineered cartilage heals skull defects. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**. V. 137, n. 2, p. 162-169, 2010.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. **The International Society for Cellular Therapy position statement**, v.8, n. 4 p.315-317, 2006.

DUSSE, L.M.S. et al. Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e sua aplicação em odontologia. **RBAC**, vol. 40, n.3, p. 193-197, 2008.

FAGHIHI, F.; ESLAMINEJAD, M. B. The effect of nano-scale topography on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 157, [Epub ahead of print], 2013.doi: 10.5507/bp.2013.013.

FISCHER, E.M. et al. Bone formation by mesenchymal progenitor cells cultured on dense and microporous hydroxyapatite particles. **Tissue Eng** v. 9, n. 6, p. 1179–1188, 2003.

FLEMMING, R.G. et al. Effects of synthetic micro- and nano structured surfaces on cell behavior. **Biomaterials**, v. 20, n. 6, p.573-88, 1999.

FUCHS, E.; SEGRE, J.A. Stem cells: a new lease on life. **Cell**, v. 100, n. 1, p.143-155, 2000.

FUKUI, N. et al. Bone tissue reaction of nanohydroxyapatite/ collagen composite at the early stage of implantation. **Biomed Mater Eng** v. 18, n. 1, p. 25–33, 2008.

GERRARD, J.M. Platelet aggregation: celular regulation and physiologic role. **Hosp Pract**, v. 23 p. 89-92, 1988.

GEUSENS, P.P.; BOONEN, S. Osteoporosis and the growth hormone-insulin-like growth factor axis. **Horm Res**, v. 58, n. 3, p. 49-55, 2002.

GRONTHOS, S. et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and *in vivo*. **Proc Natl Acad Sci**, v. 97, n. 25, p. 13625-13630, 2000.

HANSEN-ALGENSTAEDT, N. et al. Sequential changes in vessel formation and micro-vascular function during bone repair. **Acta Orthop**, v. 77, n. 3, p. 429-439, 2006.

HE, H. et al. Biocompatibility and osteogenic capacity of periodontal ligament stem cells on nHAC/PLA and HA/TCP scaffolds. **J Biomater Sci Polym Ed**, 2010.

HENG, B.C. et al. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage in vitro. **J Bone Miner Res**, v. 19. N. 9, p. 1379–1394, 2004.

HOLLINGER, J.O. et al. Recombinant human platelet-derived growth factor: biology and clinical applications. **J Bone Joint Surg Am**, v. 90, n. 1, p. 48-54, 2008.

HUDSON-GOODMAN, P.; GIRARD, N.; JONES, M.B. Wound repair and the potential use of growth factors. **Heart Lung**, v. 19, p. 379-384, 1990.

HUTMACHER, D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. **Biomaterials**, v. 21, n. 24, p. 2529–2543, 2000.

HUTMACHER, D.W. et al. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. **J Tissue Eng Regen Med** v. 1, n. 4, p. 245–260, 2007.

HWANG, Y.J.; CHOI, J. Y. Addition of Mesenchymal Stem Cells to the Scaffold of Platelet-Rich Plasma Is Beneficial for the Reduction of the Consolidation Period in Mandibular Distraction Osteogenesis. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 68, n. 5, p. 1112-1124, 2010.

ITO, Y. Surface micropatterning to regulate cell functions. **Biomaterials**, v. 20, n. 23-24, p.2333-2342, 1999.

IVANOVSKI, S. et al. Stem cells in the periodontal ligament. **Oral Dis**, v.12, n. 4, p. 358-63, 2006.

JACQUES, J.W. et al .O papel da poliuretana de mamona como substituto do enxerto ósseo autógeno em coelhos. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 31, n. 4, p. 236-241, 2004.

JAFARIAN et al. Marrow-derived mesenchymal stem cells-directed bone regeneration in the dog mandible: A comparison between Biphasic calcium phosphate and Natural bone mineral. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod.**, v. 105, n. 5, p. e14-24, 2008.

JANKOWSKI, R.J.; DEASY, B.M.; HUARD, J. Muscle-derived stem cells. **Gene Ther**, v. 9, n. 10, p.642-647, 2002.

JANSSENS, K. et al. Transforming growth factor-beta1 to the bone. **Endocr Rev**, v. 26, n. 6, p. 743-774, 2005.

JEON, O. et al. In vivo bone formation following transplantation of human adipose-derived stromal cells that are not differentiated osteogenically. **TissueEng Part A**, v. 14, n. 8, p. 1285-1294, 2008.

JIANG, X. et al. Mandibular repair in rats with premineralized silk scaffolds and BMP-2-modified bMSCs. **Biomaterials**, v. 30, n. 27, p. 4522–4532, 2009.

JOSEPH, B.K. et al. In situ hybridization evidence for a paracrine/autocrine role for insuline-like growth factor I in tooth development. **Growth Factors**, v. 13, n. 1-2, p. 11-17, 1996.

KATO, T. et al. Osteogenic potential of rat stromal cells derived from periodontal ligament. **J Tissue Eng Regen Med**, 2011.

KATZ, A.J. et al. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose derived-adherent stromal (hADAS) cells. **Stem Cells**, v. 23, n. 3, p. 412–423, 2005;

KEMPEN, D.H. et al. Growth factor Interactions in Bone Regeneration. **TissueEng Part B Rev.**, v. 16, n. 6, p. 551-566, 2010.

KERKIS, I. et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. **Cells Tissues Organs**, v. 184, p. 105–116, 2006.

KHOJASTEH, A.; ESLAMINEJAD, M.R.B.; NAZARIAN, H. Mesenchymal stem cells enhance bone regeneration in rat calvarial critical size defect more than platelete rich plasma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod.**,v. 106, n. 3, p. 356-362, 2008.

KON, E. et al. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. **J Biomed Mater Res**, v. 49, n. 3, p. 328–337, 2000.

KRETLOW, J.D. et al. Injectable Biomaterials for Regenerative Complex Craniofacial Tissues. **Adv Mater**, v. 21, n. 32-33, p. 3368-3393, 2009.

KROLL, M.H.; SCHAFER, A.I. Biochemical mechanism of platelet activation. **Blood**, v. 74, p. 1181-1184, 1989.

LAINO, G. et al. Dental pulp stem cells can be detected in aged humans: An useful source for living autologous fibrous bone tissue (LAB). **J Bone Mineral Res**, v. 20, p. 1394–1402, 2005.

LAINO, G. et al. An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering. **J Cell Physiol**, v. 206, p. 693–701, 2006.

LANGER, R.; VACANTI, J.P. Tissue engineering. **Science**, v. 260, n. 5110, p. 920-926, 1993.

LAWRENCE, D.A. Latent-TGF-beta: an overview. **Mol Cell Biochem**, v. 219, p.163, 2001.

LENDECKEL, S. et al. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 32, n. 6, p. 370–373, 2004.

LIU, Q. et al. A comparative study of proliferation and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells on akermanite and β -TCP ceramics. **Biomaterials** v. 29, n. 36, p. 4792–479, 2008.

LORENZO, J.; HOROWITZ, M.; CHOI, Y. Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. **Endocr Rev**, v. 29, n. 4, p. 403-440, 2008.

LOTINUN, S.; SIBONGA, J.D.; TURNER, R.T. Differential effects of intermittent and continuous administration of parathyroid hormone on bone histomorphometry and gene expression. **Endocrine**, v.17, n. 1, p. 29-36, 2002.

LUU, H.H. et al. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **J Orthop Res**, v.25, p. 665-677, 2007.

MACEDO, L.G.S. et al. Osso Humano Fresco Congelado em Reconstruções ósseas: Estudo Retrospectivo e Relato de Casos. **Implant News**. V. 4, n. 1, p. 50-56, 2007.

MACEDO, L.G.S.; MACEDO, N.L.; MONTEIRO, A.S.F. Fresh-frozen human bone graft for repair of defect after adenomatoid odontogenic tumour removal. **Cell Tissue Bank**, v. 10, n. 3, p. 221-226, 2009.

MANKANI, M.H. et al. Canine cranial reconstruction using autologous bone marrow stromal cells. **Am J Pathol**, v. 168, n. 2, p. 542–550, 2006.

MARX, R.E. Clinical application of bone biology to mandibular and maxillary construction. **Clin Plast Surg**, v.21, n. 3, p. 377-392, 1994.

MARX, R.E. et al. Platelet Rich Plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surg Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 85, p. 638-641, 1998.

MARX, R.; GARG, A.K. Bone graft physiology with use of platelet-rich plasma and hyperbaric oxygen. **Quintessence**, p. 183-189. 1999.

MCNAMARA, L;E. et al. Nanotopographical Control of Stem Cell Differentiation. **J Tissue Eng**, v. 2010, n. 120623,p. 1-13, 2010.

MEINEL, L. et al. Localized insulin-like growth factor I delivery to enhance new bone formation. **Bone**, v.33, p. 660-672, 2003.

MINAMIDE, A. et al. The effects of bone morphogenetic protein and basic fibroblast growth factor on cultured mesenchymal stem cells for spine fusion. **Spine**, v. 32, n. 10, p.1067-1071, 2007.

MISCH C.M. et al. Reconstruction of maxillary alveolar defects with mandibular symphysis grafts for dental implants: A preliminary reports. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 7, n. 3, p.360-366, 1992.

MIURA, M. et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 10, p.5807-5812, 2003.

MONTERO-ODASSO, M.; DUQUE, G. Vitamin D in the aging musculoskeletal system: an authentic strength preserving hormone. **Mol Aspects Med**, v. 26, 203-219, 2005.

MORISHITA, T. et al. Tissue engineering approach to the treatment of bone tumors: three cases of cultured bone grafts derived from patients' mesenchymal stem cells **Artif Organs**, v. 30, n. 2, p. 115-118, 2006.

MORRISON, S.J.; SHAH, N.M.; ANDERSON, D.J. Regulatory mechanisms in stem cell biology. **Cell**, v. 88, n. 3, p. 287-298, 1997.

NAKAJIMA, T. et al. Evaluation of posterolateral spinal fusion using mesenchymal stem cells: differences with or without osteogenic differentiation. **Spine**, v. 32, n. 22, p.2432-2436, 2007.

NAKASHIMA, M.; REDDI, A.H. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. **Nat Biotechnol**, v. 21, n. 9, p. 1025-1032, 2003.

NAKASHIMA, T.; TAKAYANAGI, H. The dynamic interplay between osteoclasts and the immune system. **Arch Biochem Biophys**, v. 473, p. 166-171, 2008.

NEER, R.M. et al. Effect of parathyroid hormone (1–34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. **N Engl J Med**, v. 344, n. 19, p. 1434-1441, 2001.

NEO, M.; MATSUHITA, M.; MORITA, T. Pseudoaneurysm of the deep circumflex iliac artery: a rare complication of an anterior iliac bone graft donor site. **Spine**, v.25, n. 14, p. 1848-1851, 2000.

NIU, T.; ROSEN, C.J. The insulin-like growth factor-I gene and osteoporosis: a critical appraisal. **Gene**, v. 361, p. 38-56, 2005.

NUTTALL, M.E.; GIMBLE, J.M. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. **Curr Opin Pharmacol**, v. 4, n. 3, p. 290-294, 2004.

PAMULA, E. et al. Nanoscale organization of adsorbed collagen: influence of substrate hydrophobicity and adsorption time. **J Colloid Interf Sci**, v. 271, p. 80-91, 2004.

PAPACCIO, G. et al. Long-Term Cryopreservation of Dental Pulp Stem Cells (SBP-DPSCs) and Their Differentiated Osteoblasts: A Cell Source for Tissue Repair. **JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY**, v. 208, p. 319–325, 2006.

PARK, J.S. et al. The effect of matrix stiffness on the differentiation of mesenchymal stem cells in response to TGF-beta. **Biomaterials**, v. 32, n. 16, p. 3921-3930, 2011.

PERSIDIS, A. Tissue engineering. **Nat Biotechnol**, v. 17, n. 5, p.508-510, 1999.

PETITE, H. et al. Tissue engineered bone regeneration. **Nat Biotechnol**, v. 18, n. 9, p. 959– 963, 2000.

PIGNONE, V.N. **Regeneração óssea alveolar utilizando osso liofilizado, matrigel e células-tronco mesenquimais em coelhos**. 2011. 114 p. Dissertação (Mestrado em Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande de Sul, Rio Grande do Sul.

PITTENGER, M.F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v.284, n. 5411, p. 143-147, 1999.

QUARTO, R. et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. **N Engl J Med**, v. 344, n. 5, p. 385–386, 2001.

QIN, L.; RAGGATT, L.J.; PARTRIDGE, N.C. Parathyroid hormone: a double-edged sword for bone metabolism. **Trends Endocrinol Metab**, v.15, n. 2, p. 60-65, 2004.

RAUH, J. et al. Bioreactor systems for bone tissue engineering. **TissueEng Part B Rev.**,v. 17, n. 4, p.263-280, 2011.

REDDI, A.H. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. **Nat Biotech**, v. 16, n. 3, p.247-252, 1998

REDDI, A.H. Interplay between bone morphogenetic proteins and cognate binding protein in bone and cartilage development: noggin, chordin and DNA. **Arthritis Res**, v. 3, n. 1, p. 1-5, 2001.

Rocha, R. Fronteiras terapêuticas em expansão: engenharia de tecidos e células-tronco. **Dental Press J Orthod**. v. 16, n. 5, p. 17-19, 2011.

SCHMIDLIN, P.R.; JUNG, R.E; SCHUG, J. Prevention of alveolar ridge resorption after tooth extraction – a review. **Schweiz Monatsschr Zahnmed**, v. 114, n. 4, p.328-336, 2004.

SCHMITZ, J.P.; HOLLINGER, J.O. The biology of platelet-rich plasma. **J Oral maxilla-fac Surg**, v. 59, p. 1119, 2001.

SCHWINDT, T.T.; BARNABÉ, G.F.; MELLO, L. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. **J Bras Neurocirurg**, v. 16, n. 1, p. 13-19, 2005.

SEO, B.M. et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. **Lancet**, v. 364, n. 9429, p. 149–155, 2004.

SEO, B.M. et al. SHED repair critical-size calvarial defects in mice. **Oral Dis**, v. 14, n. 5, p. 428–434, 2008.

SHARMA, R.I.; SNEDEKER, J.G. Biochemical and biomechanical gradients for directed bone marrow stromal cell differentiation toward tendon and bone. **Biomaterials**, v. 31, n. 30, p. 7695-7704, 2010.

SHEVDE, N.K. et al. A potent analog of 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 selectively induces bone formation. **Proc Natl Acad Sci**, v. 99, n. 21, p. 13487-13491, 2002.

SIEGEL, R.W.; FOUGERE, G.E. Mechanical properties of nanophase metals. **Nanostruct Mater**, v. 6, p. 205-214, 1995.

SINANAN, A. C.; HUNT, N. P.; LEWIS, M. P. Human adult craniofacial muscle-derived cells: neural-cell adhesion molecule (NCAM; CD56)-expressing cells appear to contain multipotential stem cells. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 40, p. 25–34, 2004.

SONG, L. et al. Identification and functional analysis of candidate genes regulating mesenchymal stem cell self-renewal and multipotency. **Stem Cells** v. 24, n. 7, p. 1707-18, 2006.

SROUJI, S.; KIZHNER, T.; LIVNE, E. 3D scaffolds for bone marrow stem cell support in bone repair. **Regen Med** v. 1, n. 4, p. 519–528, 2006.

STEVENS, M.M.; GEORGE, J.H. Exploring and engineering the cell surface interface. **Science** v. 310, n. 5751, p. 1135–1138, 2005.

SUN, H. et al. Proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived stromal cells on akermanite-bioactive ceramics. **Biomaterials** v. 27, n. 33, p. 5651–5657, 2006.

SYROID, D.E. et al. A role for insulin-like growth factor-I in the regulation of Schwann cell survival. **J Neurosci**, v. 19, n. 6, p. 2059-2068, 1999.

TAKAHASHI, K; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v.126, 663-676. 2006.

TAKAYANAGI, H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. **Nat Rev Immunol**, v.7, 292-304, 2007.

THESLEFF, I.; TUMMERS, M. Stem cells and tissue engineering: prospects for regenerating tissues in dental practice. **MedPrincPract**, v. 12 (Suppl1), p. 43-50, 2003.

TÖNZÜM, T.F.; DEMIRALP, B. Platelet-rich plasma: A promising innovation in dentistry. **Oral Surg Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 95, n. 5, p. 521-528, 2003.

TROPEL, P. et al. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. **Exp Cell Res**, n. 295, p. 395-406, 2004.

UNDALE, A.H. et al. Mesenchymal Stem Cells for Bone Repair and Metabolic Bone Diseases. **Mayo ClinProc**, v. 84, n. 10, p. 893-902, 2009.

VITAL, C.C. et al. Biocompatibilidade e comportamento de compósitos de hidroxiapatita em falha óssea na ulna de coelhos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, n.2,p.175-183, 2006.

WAHL, D.A.; CZERNUSZKA, J.T. Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair. **Eur Cell Mater** v. 11, p. 43–56, 2006.

WARNKE, P.H. et al. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. **Lancet**, v. 364, n. 9436, p. 766–770, 2004.

WATT, F.M.; HOGAN, B.L. Out of Eden: stem cells and their niches. **Science**, v. 287, n. 5457, p. 1427-1430, 2000.

WEITZMANN, M.N.; PACIFICI, R. The role of T lymphocytes in bone metabolism. **Immunol Rev**, v. 208, 154-168, 2005.

WICKHAM, M.Q. et al. Multipotent stromal cells derived from infrapatellar fat pad of knee. **ClinOrthopRelat Res**, v. 9, n. 412, p. 196-212, 2003.

WITKOWSKA-ZIMNY, M; WROBEL, E. Perinatal sources of mesenchymal stem cells: Wharton's jelly, amnion and chorion. **Cell MolBiol Letter**, v. 16, n. 3, p. 493-514, 2011.

WOOD, A. Contact guidance on microfabricated substrata: the response of teleosts in mesenchyme cells to repeating topographical patterns. **J CellSci**, v. 90, n. 4, p. 667-681, 1988.

WOZNEY, J.M. Overview of bone morphogenetic proteins. **Spine**, v. 27, 2002.

XIA, L. et al. Proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells on akermanite and β -TCP bioceramics. **Eur Cell Mater**, v. 22, p. 68–82, discussion 83, 2011.

YAMADA, Y. et al. Promising cell-based therapy for bone regeneration using stem cells from deciduous teeth, dental pulp, and bone marrow. **Cell Transplant**, 2010.

YOON, E. et al. In vivo osteogenic potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model. **Tissue Eng**, v. 13, n. 3, p. 619–627, 2007.

ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. PESQUISAS COM CÉLULAS-TRONCO: ASPECTOS CIENTÍFICOS, ÉTICOS E SOCIAIS. **Seminário Instituto Fernando Henrique Cardoso**, 2004.

ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. Células-tronco – A fronteira da Medicina. **Atheneu**, p. 245, 2006.

ZHANG, Z. Bone regeneration by stem cell and tissue engineering in oral and maxillofacial region- review. **Springer**, V. 5, n. 4, p. 401–413, 2011.